

University of Groningen

Exploring chemical versatility within the tautomerase superfamily

Baas, Jan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Baas, J. (2014). *Exploring chemical versatility within the tautomerase superfamily: Catalytic promiscuity and the emergence of new enzymes*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 8

Nederlandse samenvatting voor de geïnteresseerde leek

De vinken van Darwin.

Op 27 december 1831 zeilde het schip de H.M. Beagle uit de haven van het Engelse Devonport (bij Plymouth) met als doel het opmeten en in kaart brengen van Patagonië en Vuurland. Een ambitieus plan voor die tijd, maar toch zou de reis van de Beagle niet hierom, maar vanwege iets heel anders wereldberoemd worden. Aan boord bevond zich namelijk een jonge – hij was toen pas 22 jaar – natuuronderzoeker genaamd Charles Darwin (afb.1, links). Tijdens de reis van de Beagle die vijf jaar zou duren, bestudeerde hij overal waar hij onderweg aan land kwam de lokale natuur. Darwin verzamelde vele specimina aan planten en dieren en bestudeerde de natuurlijke historie van iedere plaats aan de hand van de geologie. Tijdens de reis verwonderde hij zich over de enorme diversiteit aan plant- en diersoorten die hij zag en hoe goed deze voor hun specifieke leefomgeving geschikt waren.

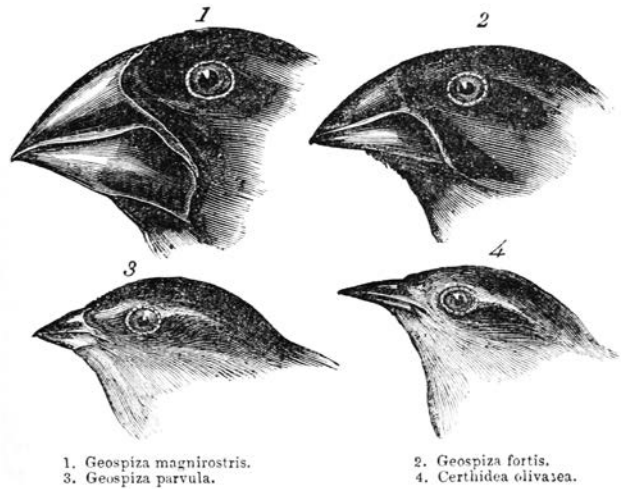
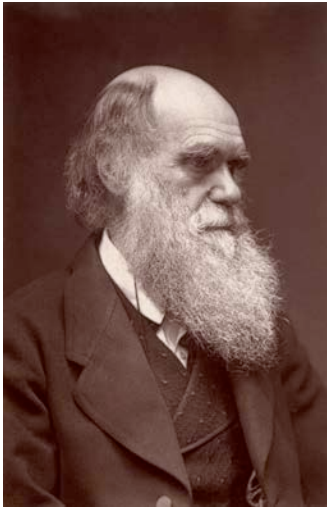
Zo gebeurde het dat de Beagle in september 1834 aankwam bij de Galápagos-archipel, een eilandengroep in de Stille Oceaan, 600 mijl voor de kust van Ecuador, ter hoogte van de evenaar. Naast het feit dat hij er ritjes maakte op de ruggen van enorme reuzenschildpadden, viel Darwin's oog op de geologie van de eilanden en de bijzondere varianten van bekende diersoorten die er leefden. Darwin wist dat de eilandengroep door vulkanische werking was gevormd en dat ze geologisch gezien relatief jong was. Hij concludeerde dat de dieren en planten die er leefden er ooit vanaf het vaste land (Zuid-Amerika), door de lucht of via zeestromingen, terecht waren gekomen. Maar, de soorten van de Galápagos-archipel waren niet meer dezelfde als diegene die op het vaste land voorkwamen. Vooral de vinken (afb.1, rechts), die van eiland tot eiland een anders gevormde snavel hebben, vielen Darwin op en dat deed een idee in zijn hoofd ontkiemen, hoewel hij er op dat moment zelf nog niet in geloofde:

“Die verschillende overgangen in bouw bij eene zoo kleine nauw verwante vogelgroep, zouden ons werkelijk in den waan kunnen laten dat uit een oorspronkelijk klein aantal vogels ééne soort was uitgenomen en voor verschillende doeleinden gewijzigd.”

Waanbeeld of niet, het idee schoot wortel in het brein van Darwin; het werd de basis van de zogenaamde evolutietheorie waar hij beroemd om is geworden. Na terugkomst in Engeland in 1836 ging Darwin zijn observaties en ideeën verder uitwerken. De kernvraag waar hij zich mee bezig hield was hoe al die verschillende diersoorten waren ontstaan die hij tijdens zijn reis had gezien. Darwin werkte 24 jaar aan het vinden en uitwerken van een verklaring, die de evolutietheorie wordt genoemd. In 1859 verscheen zijn grote levenswerk onder een titel die in het kort de hele evolutietheorie samenvat. Deze luidde:

“On the Origin of Species by means of Natural Selection. Or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.”

(Het ontstaan van soorten door natuurlijke selectie. Ofwel het bewaard blijven van rassen die in het voordeel zijn in de strijd om het bestaan)



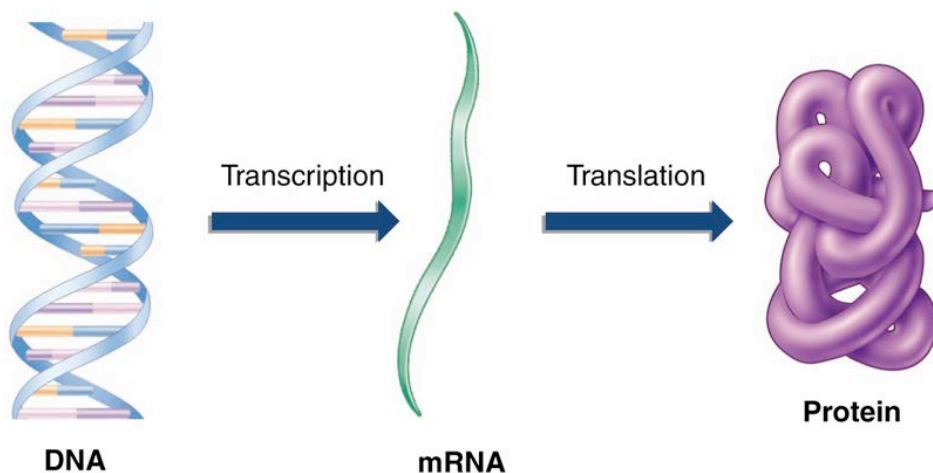
Afbeelding 1. Links, portretfoto van Charles Darwin (1809-1882) gemaakt rond 1874. Bron: Portraits of Charles Darwin, www.wikipedia.org. Rechts, vier soorten vinken die Darwin tegenkwam op de Galápagos-archipel, let op de verschillende vormen van de bek. Bron: C. Darwin, *De reis om de wereld : dagboek van onderzoekingen in de natuurlijke geschiedenis en aardkunde van de landen, bezocht op de reis rondom de wereld van H. M. vaartuig "The Beagle"*. Amsterdam, Maatschappij voor de goede en goedkope lectuur, 1911.

De evolutietheorie gaat ervan uit dat er kleine verschillen bestaan tussen individuen van een bepaalde soort, net zoals ook mensen allemaal verschillend zijn. Het ene individu is beter aangepast aan zijn omgeving dan het andere. In de strijd om het bestaan zal het best aangepaste individu de meeste nakomelingen achterlaten, noem dit het recht van de sterkste of beter gezegd, natuurlijke selectie. De eigenschappen van het best aangepaste individu blijven zodoende bewaard en die van de minder aangepaste zullen verdwijnen. Na veel generaties worden zo bepaalde eigenschappen geselecteerd en verandert een soort gaandeweg. Uiteindelijk kan dit leiden tot het ontstaan van een geheel nieuwe soort die totaal verschillend is van dat ene individu waar deze stamboom ooit mee begonnen is.

Dit proces wordt wel 'divergente evolutie' genoemd en het idee had zich al in 1837 in Darwin's hoofd gevormd. In een aantekeningboekje getiteld '*Transmutatie van soorten*' schetste hij als eerste wetenschapper in de geschiedenis een evolutionaire stamboom om dit idee vast te leggen (afb. 2).

Evolutie op moleculair niveau, hoe werkt dat?

Darwin's evolutietheorie is een algemene theorie over het ontstaan van soorten en hele populaties daarvan, maar evolutie is een proces dat zich uiteindelijk afspeelt binnen individuen van deze soorten. Per individu zijn er verschillen die de basis vormen van het proces van natuurlijke selectie. Waar komen deze verschillen vandaan?



Afbeelding 3. Van DNA naar eiwit. DNA bevat gecodeerde stukjes informatie om eiwitten te maken. Deze stukjes code worden genen genoemd. De code wordt eerst afgelezen – transcriptie – wat een afschrift genaamd ‘mRNA’ oplevert. Het ‘mRNA’ wordt vervolgens vertaald – translatie – naar een daadwerkelijk eiwitmolecuul (protein). Bron: G. Johnson, *The Living World*, 6^e editie (2010), McGraw-Hill, gereproduceerd met toestemming van McGraw-Hill Education.

Darwin's evolutietheorie beschrijft het ontstaan van soorten in dit grote geheel van het leven op aarde. Maar is zijn theorie ook terug te voeren tot de kleine bouwstenen van het leven, de eiwitten in onze cellen? Zo ja, hoe zou de evolutie op het microscopisch kleine, het moleculair niveau van eiwitten, dan in zijn werk gaan? Verschillen tussen individuen van een bepaalde soort kunnen vaak teruggevoerd worden tot verschillen in bepaalde eiwitten. Het gen dat voor zo'n eiwit in codevorm ligt opgeslagen op het DNA, is dus ook nèt iets verschillend tussen deze individuen. Een dergelijk verschil wordt een genetische mutatie genoemd en deze mutaties vormen de fundamentele basis voor het evolutieproces. Genetische mutaties ontstaan namelijk spontaan en wanneer een mutatie een eigenschap van een individu positief beïnvloedt, dan is dit individu 'sterker' of, in de woorden van Darwin, beter aangepast aan zijn leefomgeving. Een dergelijke eigenschap zal tijdens het evolutieproces bewaard blijven. Het samenspel van vele gunstige genetische mutaties kan zo uiteindelijk na vele generaties een nieuwe soort opleveren.

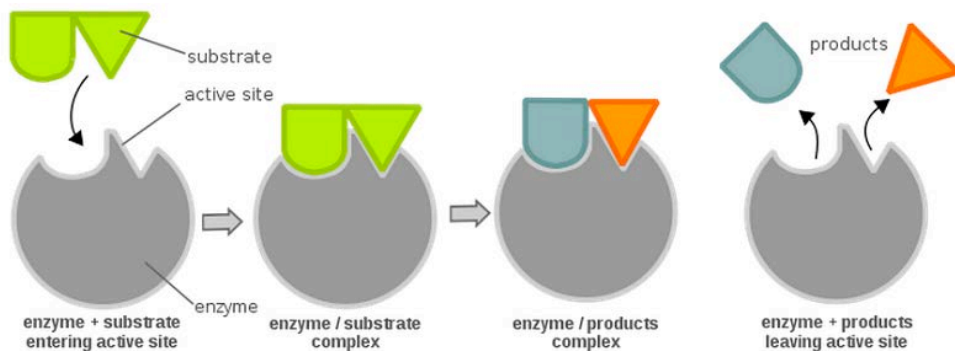
Zo'n theorie op papier is mooi, maar kunnen we het in de praktijk ook daadwerkelijk waarnemen? En daarmee de werking van de evolutietheorie van Darwin op moleculair niveau ontrafelen?

De evolutie van enzymen.

Wat zijn enzymen? In de eerste plaats zijn enzymen eiwitten. In onze cellen zitten duizenden verschillende eiwitten die allemaal een specifieke functie hebben, het ene eiwit dient als bouwsteen en geeft de cel stevigheid, weer anderen zorgen ervoor dat cellen voedingsstoffen kunnen opnemen, enzovoort. Enzymen vormen een speciale

groep eiwitten die chemische reacties uitvoeren. Ze zetten de chemische stof A om in stof B, zonder dat ze daarbij zelf verbruikt worden. Deze bijzondere eigenschap wordt in de chemie 'katalyse' genoemd. Enzymen zijn zogenaamde 'katalysatoren'. Denk bijvoorbeeld aan de afbraak van voedsel in ons lichaam, daarbij spelen enzymen een cruciale rol. Zij breken het voedsel dat wij eten af en zetten het om in nuttige stoffen die de cellen in ons lichaam kunnen gebruiken als energiebron. Enzymen, net als alle andere soorten eiwitten, vormen zo een basisonderdeel van het leven op aarde. Als het leven op aarde evolueert, dan betekent dit dus uiteindelijk dat ook enzymen evolueren. Kunnen we de theorie van de evolutie van eiwitten toetsen door in het laboratorium te onderzoeken hoe enzymen evolueren?

Hoe werken enzymen? Dit is een vraag waar chemici en biologen zich al ruim een eeuw mee bezig houden. Als snel kwam men op een idee dat aardig dicht bij de werkelijkheid komt. Men stelde het 'lock and key' mechanisme (afb. 4) voor: het enzym dat stof A omzet bevat een bindingsplaats waar stof A precies in past. Stof A wordt ook wel het substraat van het enzym genoemd en de bindingsplaats de 'active site'. Zodra stof A en het enzym een complex hebben gevormd, vindt er katalyse plaats en wordt A omgezet naar B. Als het enzym stof B heeft losgelaten, dan kan het weer een nieuw molecuul van stof A binden, enzovoort.



Afbeelding 4. Het 'lock and key' mechanisme. Een enzymmolecuul bevat een bindingsplaats – de 'active site' – waar het substraatmolecuul waar het enzym een reactie mee katalyseert precies in past. Eerst vormen de beide een complex, waarna de chemische reactie optreedt die door het enzym wordt gekatalyseerd. Het resultaat is een complex tussen het enzym en de reactieproducten. Het enzym laat de producten vervolgens los. Wat opvalt is dat het enzym tijdens het hele proces niet verandert; het kan na afloop weer een nieuw substraatmolecuul binden en weer een nieuwe reactie katalyseren, enz. enz. Een enzym is dus een heel efficiënt hulpmiddel om chemische reacties uit te voeren. Bron: Induced fit diagram, by Tim Vickers, www.wikipedia.org.

Maar nu terug naar de evolutie. Evolutie vindt plaats door veranderingen in de omgeving van levende organismen. In termen van chemische reacties voor enzymen komt dit er bijvoorbeeld op neer dat door zo'n verandering plotseling geen stof A meer voor handen is, maar stof X. En daarnaast is stof B niet meer nodig, maar nu stof Y. Er is

nu dus geen enzym nodig dat A omzet naar B, maar X naar Y! Maar, waar moet zo'n enzym dan vandaan komen? Kan het zo zijn dat het enzym dat A naar B omzet, geëvolueerd kan worden tot een enzym dat X omzet naar Y?

Om hier een antwoord op te vinden, moeten we weer terug naar het 'lock and key' mechanisme. Hoe strikt is dit mechanisme? Kan een enzym dat specifiek stof A bindt echt alleen maar een reactie met stof A katalyseren? In de afgelopen twintig jaar is een aantal enzymen ontdekt dat het niet zo strikt neemt, deze katalyseren een reactie met meer dan één substraat. Sterker nog, ze blijken in staat om verschillende soorten reacties met verschillende substraten uit te voeren. Deze enzymen zijn dus niet zo specifiek, het is een eigenschap die 'katalytische promiscuïteit' wordt genoemd. Dit bleek een zeer relevante ontdekking te zijn geweest en in de jaren nadat het eerste voorbeeld werd ontdekt, bleek het voor veel meer enzymen het geval te zijn. Momenteel is duidelijk dat het een vrij algemene eigenschap van enzymen is. Dit deed wetenschappers op het idee komen dat katalytische promiscuïteit wellicht een rol zou kunnen spelen in de evolutie van enzymen. Alleen was ook hier weer de vraag, hoe dan?

Uit onderzoek bleek dat enzymen in cellen een specifieke hoofdtaak hebben, dat is vaak het uitvoeren van één specifieke chemische reactie en het enzym is hiervoor volledig geoptimaliseerd (het resultaat van evolutie). De reacties die als promiscuïteit worden gekatalyseerd, hebben geen direct nut voor de cel en het enzym werkt hiervoor dan ook niet optimaal. Maar wat als er een verandering optreedt in de leefomgeving van het organisme waar dit enzym in voorkomt waardoor niet stof A maar stof X omgezet moet worden? Stel je voor dat er al een enzym is dat stof X naar Y kan omzetten als vorm van katalytische promiscuïteit, het is daar dan alleen nog niet voor geoptimaliseerd. Wat er dan zou kunnen gebeuren, is dat dit enzym geëvolueerd kan worden om deze gewenste reactie optimaal te kunnen katalyseren. Dan zou blijken dat katalytische promiscuïteit, wat als eigenschap van nature in enzymen voorkomt, voor de evolutie van enzymen een cruciale rol speelt. Zou de wetenschap hiermee een fundamenteel onderdeel van het evolutiemechanisme van enzymen hebben blootgelegd?

Tautomerases, een superfamilie van enzymen.

Enzymen die in de natuur voorkomen zijn te groeperen in families en zogenaamde superfamilies, wat een groep van aan elkaar verwante enzymenfamilies is. Duidelijk is dat dergelijke superfamilies een gevolg zijn van een evolutieproces, zogenaamde divergente evolutie, dat eerder al ter sprake is gekomen. Deze enzymen stammen uiteindelijk af van één gezamenlijke voorouder. Enzymen die tot een bepaalde superfamilie behoren, zijn vaak niet in één en hetzelfde organisme te vinden, ze komen juist voor in verschillende organismen. Ook dit is een logisch gevolg van een evolutieproces, terwijl de enzymen veranderden gebeurde dit met de organismen zelf ook, met als gevolg het ontstaan van nieuwe soorten. Des te ouder een familie van enzymen is, des te wijder verspreid is dan ook hun voorkomen. De tautomerase superfamilie is oeroud, omdat familieleden ervan in praktisch alle vormen van leven op

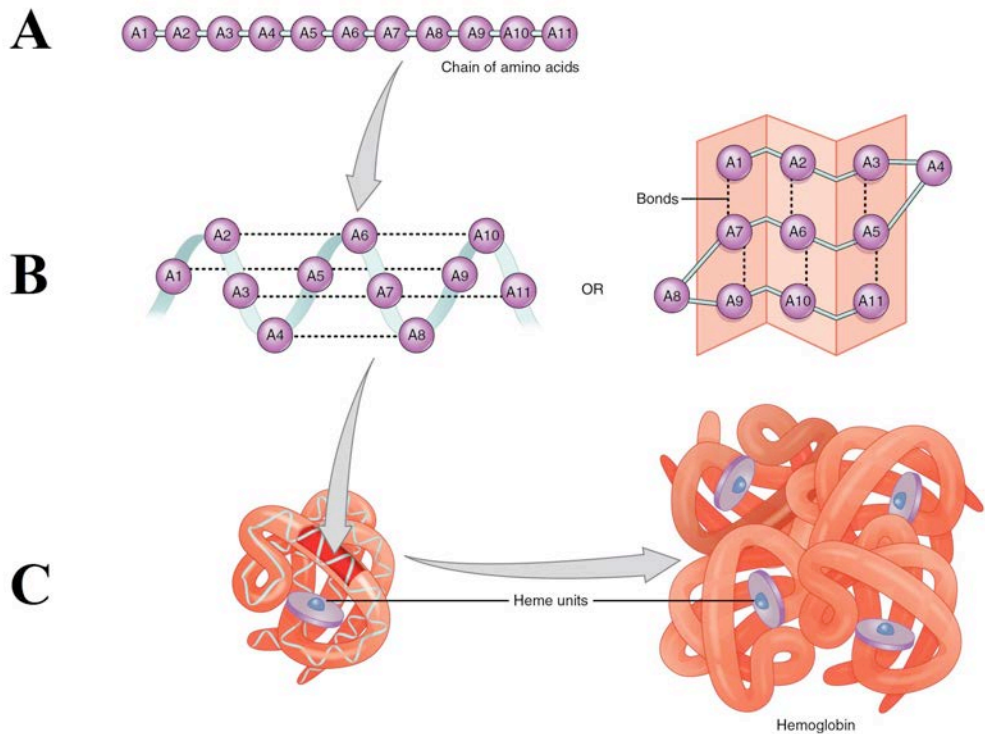
aarde voorkomen, van mens tot dier, van plant tot bacterie. Dit geeft aan dat tautomerases een lange evolutionaire geschiedenis hebben, maar ook dat ze goed te evolueren zijn; ze zijn met het leven op aarde in miljoenen jaren ook telkens mee veranderd. Dit alles maakt de tautomerase superfamilie de ideale kandidaat om de evolutie van enzymen te bestuderen.

Wat zijn tautomerases? Om deze vraag te kunnen beantwoorden moeten we eerst kijken hoe enzymen zijn opgebouwd. Enzymen bestaan uit zogenaamde aminozuren, daar bestaan er in de natuur twintig verschillende van. Aminozuren kunnen als kralen aan een ketting aan elkaar geregen worden, het wordt dan als het ware een ketting met kralen in twintig verschillende kleuren. Het ene enzym verschilt van het andere door de volgorde waarin de verschillende aminozuren aan elkaar geregen zijn en in de lengte van de uiteindelijke keten van aminozuren. Met een dergelijke keten van aminozuren gebeurt vervolgens iets bijzonders: het vouwt zich in een specifieke manier op doordat bepaalde aminozuren in de keten een interactie aan kunnen gaan, ze plakken als het ware aan elkaar vast. Het is dan ook voor te stellen dat de volgorde van de diverse aminozuren in de keten meteen ook bepaalt hoe de keten zich opvouwt: is de volgorde anders dan is de vouwing ook anders. De langgerekte keten van aminozuren wordt zo een driedimensionaal 'kluwen', maar niet een die in de knoop zit maar een die precies op die manier in elkaar moet zitten (afb. 5). In deze driedimensionale structuur zit ergens een plek waar een enzym het molecuul kan binden waar het een chemische reactie op uitvoert (stof A wordt omgezet naar stof B), de 'active site'.

Een tautomerase die tot de tautomerase superfamilie behoort onderscheidt zich van andere enzymen door een specifieke driedimensionale vorm (de vouwing van de aminozuurketen) in combinatie met één specifiek aminozuur dat altijd in de 'active site' is te vinden, het aminozuur proline. Door deze twee karakteristieke eigenschappen kunnen tautomerases verschillende chemische reacties katalyseren. Nog steeds worden nieuwe leden van deze superfamilie ontdekt en dan is het telkens spannend om te ontdekken welke reacties ze katalyseren. In dit proefschrift worden ook twee nieuw ontdekte tautomerases beschreven.

Hoe een schadelijk landbouwvergift inzicht geeft in de evolutie van enzymen.

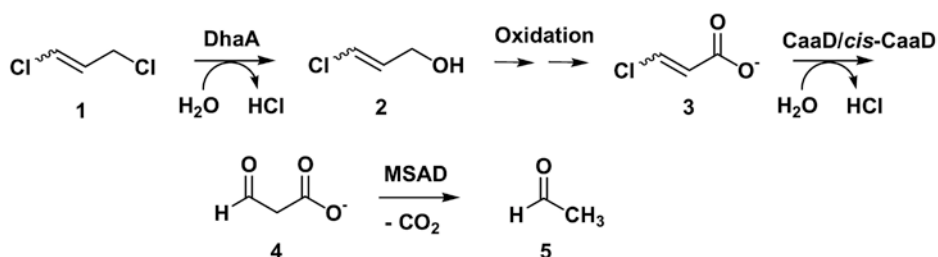
Zoals gezegd, is de tautomerase superfamilie een ideaal modelsysteem om te onderzoeken hoe evolutie plaatsvindt voor enzymen en daarmee hoe evolutie op moleculair niveau werkt. Tautomerases zijn als superfamilie al erg oud, maar toch ontstaan door evolutie nog steeds nieuwe varianten. Een frappant geval trok de aandacht van de wetenschap. In de 20^e eeuw zijn boeren landbouwvergift gaan toepassen om onkruid of ongedierte te bestrijden. Een van deze was Telon-II, een vergif dat grondwormen (nematoden) in aardappelvelden doodt. Enorme hoeveelheden



Afbeelding 5. Van aminozuurketen tot functioneel eiwit (enzym). De door het DNA bepaalde volgorde van 20 verschillende aminozuren in een keten is het resultaat van een proces dat translatie wordt genoemd (zie afb. 3). De 'kralensnoer' van aminozuren (A), de primaire structuur, gaat zich opvouwen doordat bepaalde aminozuren een interactie met elkaar aangaan. Dit levert in eerste instantie een secundaire structuur op door interacties van aminozuren die in de keten bij elkaar in de buurt zitten (B). Vervolgens vormt zich een tertiaire structuur (C) door interacties tussen aminozuren die verder van elkaar verwijderd zijn in de keten, dit zorgt er echt voor dat de keten zich ruimtelijk opvouwt. Verschillende losse ketens kunnen vervolgens nog een complex vormen (quaternaire structuur) en kunnen ook nog hulpstoffen binden, zogenaamde cofactoren ('heme units' in dit geval). Uiteindelijk leidt dit proces tot een functioneel eiwit of eiwit, zoals in dit voorbeeld hemoglobine, het eiwit in de rode bloedcellen in ons bloed, dat zuurstof bindt.

Bron: <http://en.wikipedia.org/wiki/Protein>

hiervan zijn vanaf 1946 ook in ons land in de bodem terecht gekomen. Telon-II bevat als werkzame stof de chemische verbinding 1,3-dichloorpropeen; een fractie van wat in de grond geïnjecteerd werd doodde wormen en de rest verviel al snel naar een eveneens giftige stof die 3-chlooracrylzuur heet. Dit is een nare verbinding omdat het nog steeds chloor bevat maar vooral ook omdat het ontzettend stabiel is: het heeft een halfwaardetijd van maar liefst ca. 20.000 jaar. Telon-II is als vergif al lang verboden, maar over 20.000 jaar zal nog steeds ongeveer de helft van het giftige afbraakproduct 3-chlooracrylzuur in de bodem zitten.



Afbeelding 6. De afbraakroute van 1,3-dichloorpropeen (stof **1**, linksboven) zoals deze voorkomt in bepaalde groundbacteriën. Chloor is weergegeven door het chemische symbool 'Cl'. Ook in deze afbraakroute wordt 3-chlooracrylzuur (stof **3**, rechtsboven) gevormd, maar deze kan onder andere door het enzym *cis*-CaaD worden afgebroken naar de stof malonaat semialdehyde (stof **4**, linksonder). Zie dat beide chlooratomen van het 1,3-dichloorpropeen nu zijn verwijderd. Uiteindelijk is acetaldehyde (stof **5**, rechtsonder) het eindproduct van de afbraakroute, dat als voedsel voor de bacteriën dient. Bron: Poelarends, G.J. en Whitman, C.P. Evolution of enzymatic activity in the tautomerase superfamily: mechanistic and structural studies of the 1,3-dichloropropene catabolic enzymes. *Bioorganic Chemistry* (2004), 32, p. 376-392.

Toch is er hoop, de natuur is flexibel. Wat blijkt, in de bodem van de aardappelvelden komen bacteriën voor die het 3-chlooracrylzuur kunnen afbreken. Sterker nog, ze gebruiken het als voedselbron! Hoe is dit mogelijk? De stof 3-chlooracrylzuur is geen verbinding die van nature in de grond voorkomt, het is iets dat pas recent door toedoen van de mens in de natuur geïntroduceerd is. Hoe kan het dat er nu al bacteriën zijn die zich hebben aangepast om het 3-chlooracrylzuur als voedsel te kunnen gebruiken? Dit betekent dat ze over een of meerdere enzymen moeten beschikken om het 3-chlooracrylzuur te kunnen verteren. Maar waar komen deze enzymen dan zo snel vandaan? Zijn ze misschien door een snel evolutieproces gevormd? Zo ja, kan dit dan licht werpen op hoe enzymen kunnen evolueren?

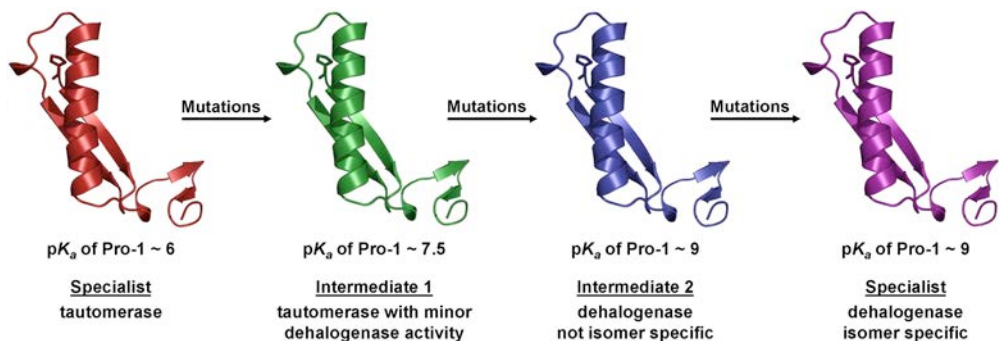
Uit onderzoek is gebleken dat een van de enzymen die in deze bacteriën bij de afbraak van 3-chlooracrylzuur is betrokken, tot de tautomerase superfamilie behoort. Het gaat om het enzym met de ingewikkelde naam *cis*-3-chlooracrylzuur dehalogenase, afgekort '*cis*-CaaD'. De naam geeft aan wat het enzym doet: een 'dé-halogenase' ontdoet een molecuul van een 'halogeen'. Chloor behoort chemisch gezien tot de halogenen: *cis*-CaaD is een enzym dat het chloor verwijdert van 3-chlooracrylzuur. Het gebruikt

daarvoor water en de producten zijn zoutzuur en een molecuul dat uiteindelijk als energiebron voor de bacterie dient (afb. 6). Het zoutzuur klinkt schadelijk, maar als het door de bacterie eenmaal is uitgescheiden en in de grond terecht komt, wordt het daar vanzelf tot onschadelijk zout omgevormd.

cis-CaaD is een bijzonder krachtig enzym, omdat het een zeer stabiel molecuul als 3-chlooracrylzuur (vandaar de lange levensduur ervan) kan afbreken. *cis*-CaaD versnelt de afbraak maar liefst met een factor $\pm 2.000.000.000.000$, oftewel tweeduizend miljard maal. Chemisch en biologisch gezien is dit een hoogstandje, men zou verwachten dat het de evolutie wel even een tijdje heeft gekost om zo'n krachtig enzym te ontwikkelen. Het tegendeel is waarschijnlijk waar en dát is nou juist het intrigerende aan *cis*-CaaD.

Hoe kunnen we onderzoeken hoe *cis*-CaaD is geëvolueerd? We kunnen helaas niet terug gaan in de tijd om te observeren hoe het is gebeurd. Maar zijn er in de natuur misschien nog aanwijzingen te vinden? *cis*-CaaD is vermoedelijk het resultaat van divergente evolutie, dat betekent dat er een voorouderenzym moet zijn geweest. Zijn er nog enzymen te vinden die vergelijkbare eigenschappen hebben als dit voorouderenzym en zo ja, wat zijn die eigenschappen dan? Om deze vragen te beantwoorden kunnen we het beste op zoek gaan naar bestaande familieleden van *cis*-CaaD. Misschien geven de eigenschappen van deze familieleden ons enig inzicht in de stamboom van deze familie van enzymen. Eén familielid is al bekend, het enzym Cg10062. Een nieuwe zoektocht leverde nog een kandidaat op: het enzym MsCCH2. Dit enzym is net als *cis*-CaaD afkomstig uit een bacterie en bleek in staat om 3-chlooracrylzuur af te breken, maar niet heel efficiënt. Onderzoek heeft uitgewezen dat MsCCH2 een robuuste tautomerase activiteit bezit met als substraat de stof phenylpyruvaat. De dehalogenase activiteit van MsCCH2 is duidelijk een voorbeeld van katalytische promiscuïteit: het enzym is 'toevallig' in staat om 3-chlooracrylzuur af te breken maar de eigenlijke hoofdfunctie is iets anders. Toch stelt MsCCH2 ons in staat om het evolutieproces dat tot *cis*-CaaD heeft geleid, te reconstrueren. Katalytische promiscuïteit kan inderdaad een eigenschap zijn die een cruciale rol in het evolutieproces speelt.

MsCCH2 is minder efficiënt als dehalogenase dan het enzym Cg10062 dat al bekend was. Omgekeerd is MsCCH2 een efficiënter tautomerase dan Cg10062. Wanneer we nu kijken naar de aminozuren waaruit MsCCH2 en Cg10062 zijn opgebouwd, dan blijkt dat MsCCH2 meer verschilt van *cis*-CaaD dan Cg10062. Al met al blijkt dat MsCCH2 aardig moet lijken op het voorouderenzym waar de evolutie van *cis*-CaaD mee begonnen is en dat Cg10062 als het ware een intermediair is uit het evolutieproces, een soort momentopname. Cg10062 is al het ware al een eindje op weg om een *cis*-CaaD te worden, maar het evolutieproces is nog niet helemaal compleet. Zo is nu het idee ontstaan dat een enzym als *cis*-CaaD is geëvolueerd uit een voorouderenzym dat een tautomerase met promiscue dehalogenase activiteit was. In afbeelding 7 wordt dit proces samengevat.



Afbeelding 7. Een schematische weergave van hoe het evolutieproces voor het enzym *cis*-CaaD eruit zou hebben kunnen zien. Links begint het met een tautomerase als voorouderenzym, door het inbouwen van mutaties worden de eigenschappen gaandeweg veranderd en kan bijvoorbeeld een dehalogenase activiteit worden verhoogd. Uiteindelijk leidt dit tot de vorming van een enzym dat volledig een dehalogenase is. Bron: B. J. Baas, E. Zandvoort, A. A. Wasielec, W. J. Quax, G. J. Poelarends, *Biochemistry* **2011**, 50, 2889-2899.

Hoe vindt de verandering van een enzym als McCCH2, via een intermediair zoals Cg10062, naar een echt *cis*-CaaD dan plaats? Hiervoor moeten mutaties plaatsvinden die specifieke aminozuren in deze enzymen veranderen en dan juist diegene die ervoor zorgen dat de dehalogenase activiteit verhoogd wordt. Kan de lage dehalogenase activiteit van een tautomerase verhoogd worden met slechts enkele mutaties? Om deze vraag te beantwoorden, komt een heel ander tautomerase superfamilie lid, mMIF, om de hoek kijken. Onderzoek aan dit enzym heeft laten zien dat het eveneens promiscue dehalogenase activiteit bezit. Verassend genoeg bleek dat er slechts enkele mutaties nodig zijn om de dehalogenase activiteit drastisch te verhogen. De conclusie is, zodra een enzym al een beetje dehalogenase activiteit bezit in de vorm van katalytische promiscuïteit, deze dan middels enkele mutaties al significant verhoogd kan worden.

Dit is een belangrijke vondst: het betekent dat de evolutie van enzymen op een evolutionaire tijdschaal snel kan plaatsvinden. Het inbouwen van spontane mutaties in het DNA, wat uiteindelijk leidt tot een verandering in de aminozuren waaruit een enzym is opgebouwd, kost tijd. Het inbouwen van tientallen mutaties zou met de gemiddelde snelheid waarmee dit proces plaatsvindt, eeuwen kosten. Nu is gebleken dat de dehalogenase activiteit van een promiscue dehalogenase zoals mMIF al middels enkele mutaties significant verhoogd kan worden, dan betekent dit dat het evolutieproces van een tautomerase voorouderenzym naar *cis*-CaaD wellicht ook snel plaats heeft kunnen vinden. Dit kan verklaren waarom er in bacteriën in de bodem van aardappelvelden na enkele decennia al een enzym als *cis*-CaaD voorkomt, dat dus binnen enkele tientallen jaren moet zijn geëvolueerd.

Het voorspellen van nieuwe activiteiten voor bestaande enzymen.

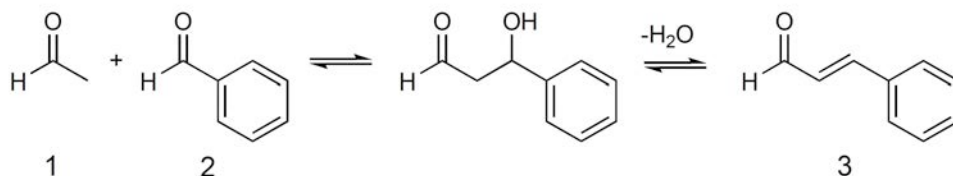
Nu we dankzij de enzymen MsCCH2 en mMIF inzicht hebben gekregen in het mechanisme van enzymevolutie, kunnen we deze kennis misschien ook toepassen in het laboratorium om een enzym te ontwikkelen dat een reactie katalyseert die een nuttig product oplevert, bijvoorbeeld iets dat kan worden gebruikt om een bepaald medicijn te maken. Het inbouwen van mutaties in het gen van een enzym is namelijk iets dat we op het laboratorium ook kunnen doen, zo kunnen we zelf selectief een enzym evolueren. De vraag is alleen, welke mutaties moeten we aanbrengen en met welk enzym moeten we beginnen?

Eerder in dit hoofdstuk is uitgelegd dat tautomerases die tot de tautomerase superfamilie behoren twee kenmerkende eigenschappen bezitten, één daarvan is het hebben van het aminozuur proline in de 'active site'. Het onderzoek naar katalytische promiscuïteit heeft ons veel inzicht opgeleverd in welke chemische rol de verschillende aminozuren kunnen vervullen in een 'active site'. Vanuit de chemie weten we ook wat aminozuren allemaal zouden moeten kunnen, in theorie. In de natuur worden al deze mogelijkheden niet noodzakelijkerwijs benut: enzymen zijn geëvolueerd voor een specifieke functie en een specifieke reactie. Dat sluit niet uit dat de betrokken aminozuren in de 'active site' meer zouden kunnen dan alleen dat, in de natuur wordt er simpelweg nog geen gebruik van gemaakt. Zouden wij deze verborgen mogelijkheden van bestaande enzymen misschien kunnen ontdekken?

Om dit te onderzoeken hebben we het enzym 4-oxalocrotonaat tautomerase – afgekort 4-OT – genomen. Van dit enzym is al veel bekend qua eigenschappen en het laat makkelijk met zich werken op het laboratorium. Als lid van de tautomerase superfamilie heeft het een proline in de 'active site'. De natuurlijke activiteit van 4-OT is het verplaatsen van een waterstofatoom van de ene plek in het substraatmolecuul 2-hydroxymuconaat, naar het andere. Dit is een klassieke 'tautomerisatiereactie'. De proline in de active site van 4-OT speelt hierbij een cruciale rol: het verplaatst het waterstofatoom. Maar proline heeft meer in petto dan dit, het zou namelijk in theorie ook een verbinding tussen twee koolstofatomen tot stand kunnen brengen en dat is interessant. Het verbinden van koolstofatomen is namelijk een cruciale reactie in het bouwen van allerlei voor de mens nuttige stoffen, waaronder medicijnen. Op deze manier zijn bouwstenen voor medicijnen op de juiste manier met elkaar te verbinden tot de werkzame stof van een bepaald medicijn. Omdat het aminozuur proline dit tot stand kan brengen, zou dat dan betekenen dat 4-OT als enzym een reactie kan katalyseren waarbij het twee koolstofatomen met elkaar verbindt?

Om dit te onderzoeken is er een modelreactie gekozen die 4-OT wellicht zou kunnen katalyseren. Het is een reactie waarbij twee kleine moleculen – acetaldehyde en benzaldehyde – aan elkaar worden gekoppeld, met als resultaat een molecuul cinnamaldehyde (afb. 8). De naam zegt het al: dit product ruikt naar kaneel (Engels: cinnamon). Dit bewijst dat 4-OT inderdaad een reactie kan katalyseren waarbij een binding tussen twee koolstofatomen tot stand komt.

Onderzoek toonde aan dat 4-OT inderdaad deze reactie kan katalyseren. Na verloop van tijd vormde het enzym cinnamaldehyde en dit was op het laboratorium ook goed te



Afbeelding 8. Een reactie waarbij een koolstof-koolstof binding tot stand komt, gekatalyseerd door het enzym 4-OT. De moleculen zijn schematisch getekend, daar waar een knik in de lijn zit, bevindt zich een koolstofatoom. Moleculen 1 (acetaldehyde) en 2 (benzaldehyde) worden aan elkaar gekoppeld door 4-OT, wat uiteindelijk 3 (cinnamaldehyde) als product oplevert. Er komt daarbij ook een molecuul water (H_2O) vrij. Bron: E. Zandvoort, B. J. Baas, W. J. Quax, G. J. Poelarends, *Chembiochem* **2011**, 12, 602-609.

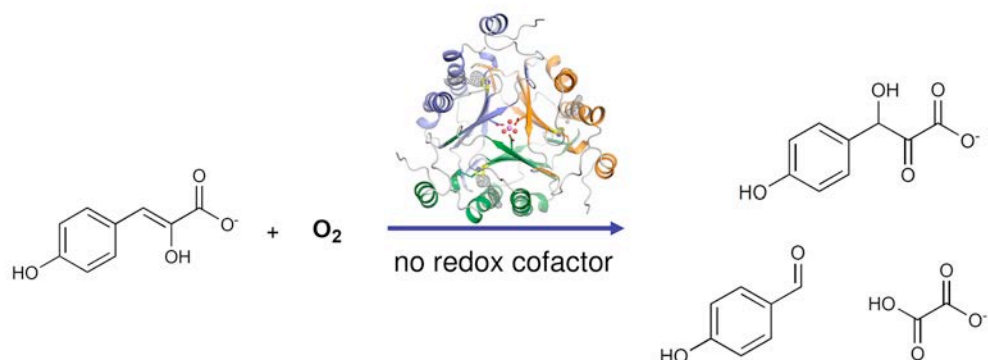
ruiken! Het hoofdstuk hierover dat in dit proefschrift is opgenomen is slechts het eerste begin, inmiddels zijn anderen met dit onderzoek verder gegaan en momenteel is het al zo ver dat 4-OT daadwerkelijk interessante producten kan maken, die voor het maken van medicijnen van groot belang zijn. Wellicht dat 4-OT in de toekomst toepassing kan vinden in een productieproces voor een bepaald medicijn. Het is nog toekomstmuziek, maar de basis die is er.

RhCC, het zwarte schaap in de tautomerase superfamilie.

De zoektocht naar nog bestaande familieleden van *cis*-CaaD verliep voorspoedig. Al snel werd MsCCH2 gevonden maar uit het onderzoek kwam nog een tweede kandidaat, genaamd RhCC, naar voren. Deze bleek evolutionair gezien nog verder verwijderd te zijn van *cis*-CaaD dan MsCCH2 en zou dus nog een stapje dichter bij het oorspronkelijke voorouderenzym van *cis*-CaaD kunnen staan. Uitermate interessant en een goede reden om RhCC op het laboratorium te gaan onderzoeken.

Het eerste resultaat was al binnen enkele maanden een feit: het was bij de eerste poging al gelukt om de driedimensionale structuur van het enzym op te helderen. Uit onderzoek bleek ook dat RhCC geen dehalogenase activiteit bezit, wat wellicht ook niet verwonderlijk is omdat het zo weinig op *cis*-CaaD lijkt. Met de andere moleculen waarvan we vermoedden dat RhCC er iets mee zou moeten kunnen, bleek het echter niet katalytisch actief te zijn. Ook kon niet worden vastgesteld dat RhCC als tautomerase actief was, iets dat wel in de lijn der verwachting lag. Enige tijd later werden de analyses nog eens herhaald en toen viel plotseling iets op: RhCC deed wel degelijk iets met een van de al eerder geteste moleculen. Dit was bij de eerdere analyses niet opgevallen omdat het product van de reactie niet datgene was wat je voor een tautomerase superfamilie lid als RhCC zou verwachten. Er bleek iets vreemds aan de hand te zijn, RhCC voerde een reactie uit op een molecuul waar andere tautomerases een standaard tautomerisatiereactie op uitvoerden, maar dat was niet wat RhCC deed. Welke soort reactie katalyseerde het dan? Het heeft uiteindelijk een aantal jaren gekost om dat te achterhalen.

Het molecuul in kwestie waar RhCC iets mee bleek te doen is 4-hydroxyphenylenolpyruvaat, afgekort 4HPP. Uit analyse bleek dat er niet één reactieproduct werd gevormd, zoals normaliter het geval is voor een enzymreactie, maar een mengsel van veel verschillende producten. Wat was hier aan de hand? Om erachter te komen welke reactie werd gekatalyseerd door RhCC, moesten de producten worden geïdentificeerd, om welke chemische stoffen ging het? Aan de hand hiervan zouden we dan kunnen beredeneren welke soort reactie RhCC katalyseert.



Afbeelding 9. De reactie die door RhCC wordt gekatalyseerd. Links voor de pijl zien we het substraat 4HPP en een molecuul zuurstof (O_2). Boven de pijl zien we het enzym RhCC als katalysator van de reactie en rechts van de pijl de reactieproducten die geïdentificeerd zijn. Let op het aantal zuurstofatomen (extra O's) na de pijl ten opzichte van voor de pijl. RhCC is een oxygenase, dat is een enzym dat een atoom zuurstof inbouwt in het substraatmolecuul.

Wat bleek het geval. Inmiddels hebben we RhCC kunnen scharen in een zeldzaam groepje enzymen die voor de wetenschap nog relatief onbekend zijn. Het gaat om zogenaamde 'cofactor-onafhankelijke oxygenases'. Deze enzymen katalyseren een reactie tussen een substraatmolecuul en zuurstof uit de lucht. Dit klinkt niet bijzonder, immers, zuurstof laat ijzer spontaan roesten en het is nodig voor het verbranden van benzine in de motor van onze auto's om maar eens iets te noemen. Dit zijn toch uiteindelijk allemaal chemische reacties waarbij zuurstof uit de lucht betrokken is? Ja, dat klopt, maar met deze reacties is iets bijzonders aan de hand dat met het zuurstof te maken heeft. Zuurstof is namelijk een bijzonder molecuul, de wetten van de kwantummechanica bepalen dat zuurstof niet zomaar aan chemische reacties kan deelnemen. Het gaat te ver om dit in detail uit te leggen, maar het komt erop neer dat zuurstof altijd hulp nodig heeft om te kunnen reageren. Dit kan een vonk zijn die een ontbranding start, maar ook een bepaalde hulpstof. Enzymen die een reactie katalyseren met zuurstof uit de lucht, gebruiken daarvoor altijd een bepaalde hulpstof, een zogenaamde 'cofactor' (zie afb. 5). Zonder een cofactor is het onmogelijk om een reactie met zuurstof uit te voeren. En nu komt het: RhCC bleek onomstotelijk een reactie met zuurstof uit te voeren terwijl het helemaal geen cofactor gebruikt!

Een zoektocht in de bestaande literatuur leerde ons dat er toch enkele enzymen bekend zijn die dit doen, ze worden daarom 'cofactor onafhankelijk' genoemd. Daarnaast heten ze oxygenases, dit zijn enzymen die een atoom zuurstof inbouwen in het eigenlijke substraatmolecuul. RhCC doet iets vergelijkbaars met het substraat 4HPP (afb. 9), maar het product dat het in eerste instantie vormt moet onstabiel zijn, het verval op verschillende manieren tot een serie afbraakproducten, wat de producten zijn die wij uiteindelijk konden detecteren. Dit bemoeilijkte het onderzoek enorm.

Uiteindelijk is het gelukt om erachter te komen welke reactie RhCC katalyseert en op het moment is het nu zover dat de resultaten van het onderzoek rijp zijn voor publicatie. Het onderzoek naar RhCC is verre van afgerond. Hoe RhCC er precies in slaagt om zonder cofactor een reactie met zuurstof te katalyseren is bijvoorbeeld nog niet geheel duidelijk. RhCC trok in eerste instantie onze aandacht omdat het lijkt op *cis*-CaaD, maar het kan goed zijn dat RhCC het eerste voorbeeld is van een nog geheel onbekende tak van de tautomerase superfamilie. Kortom, het is nog maar het topje van de ijsberg dat we nu in beeld hebben. RhCC vertelt ons eens te meer hoe weinig we eigenlijk weten. Maar het is tegelijk ook een stimulans en een opzet voor toekomstig onderzoek waarin we nog veel meer kunnen leren over de enzymen van de tautomerase superfamilie.

